

Copolymer and method for production thereof

Patent Number: ☐ EP0533144, A3, B1
Publication date: 1993-03-24
Inventor(s): SHIOTANI TAKESHI (JP); KOBAYASHI GENTA (JP)
Applicant(s): KANEGAFUCHI CHEMICAL IND (JP)
Requested Patent: ☐ JP5093049
Application Number: EP19920115858 19920916
Priority Number(s): JP19910267255 19910917
IPC Classification: C08G63/06; C12N1/20; C12P7/62
EC Classification: C08G63/06, C12P7/62A, C12R1/01
Equivalents: DE69227878D, DE69227878T, JP2777757B2, ☐ US5292860
Cited Documents: EP0440165; EP0069497

Abstract

The present invention is directed to a copolymer containing a 3-hydroxybutyrate (3HB) unit and a 3-hydroxyhexanoate (3HHx) unit, a three-component copolymer containing at least a 3-hydroxybutyrate (3HB) unit and a 3-hydroxyhexanoate (3HHx) unit, and a four-component copolymer containing at least a 3-hydroxybutyrate (3HB) unit and a 3-hydroxyhexanoate (3HHx) unit. The use of a microorganism of the genus *Aeromonas* according to the present invention makes it possible to produce a wide variety of plastic materials ranging from rigid plastics to elastic plastics by selecting copolymer components and adjusting their composition.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-93049

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 G 63/06	N L P	7211-4 J		
C 1 2 P 7/62		8114-4 B		
// (C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:01)				

審査請求 未請求 請求項の数11(全 12 頁)

(21)出願番号	特願平3-267255	(71)出願人	000000941 鐘淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(22)出願日	平成3年(1991)9月17日	(72)発明者	塩谷 武修 兵庫県加古川市野口町野口286-1 A-906
		(72)発明者	小林 元太 兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63
		(74)代理人	弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 共重合体およびその製造方法

(57)【要約】

【構成】3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットと3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットを含む共重合体、少なくとも3HBユニットと3HHxユニットを含有する3成分系共重合体、少なくとも3HBユニットおよび3HHxユニットを含有する4成分系共重合体；これらの共重合体を合成するアエロモナス・キャピエ；アエロモナス属の微生物を用いた前記の共重合体の製造方法に関する。

【効果】長鎖脂肪酸を資化してC₃～C₆ユニットを合成することができ、3HHxは3HVよりもメチレン基が1個多いので可塑性が高く、柔軟性を付与する能力を有し、3HPも強度を保持しながらも弾性を与えることができる。

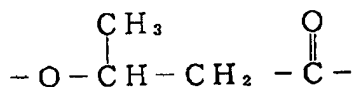
1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 3-ヒドロキシブチレート（3HB）ユニットを50モル%から98モル%、3-ヒドロキシヘキサノエート（3HHx）ユニットを50モル%から2モル%含む共重合体。

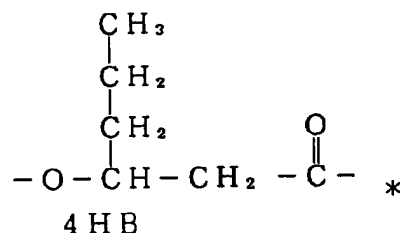
【化1】

3HB



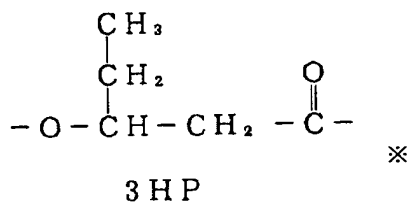
【化2】

3HHx



【化4】

3HV



【請求項5】 第3および第4成分として、4-ヒドロキシブチレート（4HB）ユニット、3-ヒドロキシバリレート（3HV）ユニットおよび3-ヒドロキシプロピオネート（3HP）ユニットからなる群から選ばれる2つのユニットを有する請求項3記載の共重合体。

【請求項6】 請求項1、2または3に記載された共重合体を合成するアエロモナス・キャビエ。

【請求項7】 アエロモナス属の微生物を、炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂を用いて、炭素源以外の栄

養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート（3HB）ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート（3HHx）ユニットからなる共重合体の製造方法。

【請求項8】 アエロモナス属の微生物を、5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸、炭素数5以上の奇数個の脂肪酸または4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラ

クトンを用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養す

ることを特徴とする、3-ヒドロキシプロピオネート（3HP）ユニット、3-ヒドロキシバリレート（3H

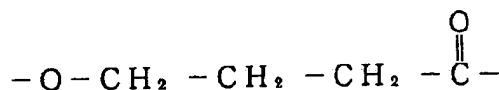
2

*【請求項2】 少なくとも3-ヒドロキシブチレート（3HB）ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート（3HHx）ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体。

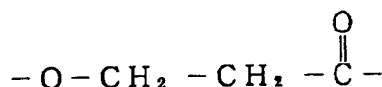
【請求項3】 少なくとも3-ヒドロキシブチレート（3HB）ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート（3HHx）ユニットを含有する4成分系のモノマーユニットからなる共重合体。

【請求項4】 第3成分として、4-ヒドロキシブチレート（4HB）ユニット、3-ヒドロキシバリレート（3HV）ユニットまたは3-ヒドロキシプロピオネート（3HP）ユニットを有する請求項2記載の共重合体。

【化3】



※【化5】



V）ユニットまたは4-ヒドロキシブチレート（4HB）ユニットを含んだ共重合体の製造方法。

【請求項9】 アエロモナス属の微生物を、炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂と、①5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸、②炭素数5以上の奇数個の脂肪酸または③4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラクトンを用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート（3HB）ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート（3HHx）ユニットと、さらに前記それぞれの炭素源に対応する①3-ヒドロキシプロピオネート（3HP）ユニット、②3-ヒドロキシバリレート（3HV）ユニットまたは③4-ヒドロキシブチレート（4HB）ユニットのいずれか1つのユニットの3成分系のモノマーユニットからなる共重合体の製造方法。

【請求項10】 アエロモナス属の微生物を、炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂と、①5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸、②炭素数5以上の奇数個の脂

肪酸または③4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラクトンのいずれか2種を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットと、さらに前記それぞれの炭素源に対応する①3-ヒドロキシプロピオネート(3HP)ユニット、②3-ヒドロキシバリレート(3HV)ユニットまたは③4-ヒドロキシブチレート(4HB)ユニットのいずれか2つのユニットの4成分系のモノマーユニットからなる共重合体の製造方法。

【請求項11】 天然油脂としてコーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚脂、牛脂の少なくともいずれかを用いる請求項7、9または10記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規共重合体ポリエステルおよびこれを発酵合成する微生物およびその製造方法に関する。詳しくは自然環境(土中、河川、海中)の下で微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子およびその製造方法に関するものである。

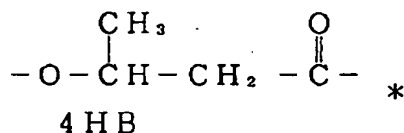
【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】現在まで数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ-β-ヒドロキシブチレート(以下、P(3HB)と略す)であり、下記の式で示されるモノマーユニット(3HB)からなるホモポリマーである。

【0003】

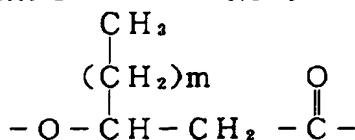
【化6】

3HB



【0008】(2) 特開昭63-226291号公報によれば、炭化水素資化菌であるシュドモナス・オレオボランスATCC29347に炭素源としてアルカンを与えることにより、炭素数が6~12までの3-ヒドロキシアリカノエート(3HAと略す)をモノマーユニットとする共重合体P(3HA)を発酵合成することが※

3HA



$$(x = m + 4)$$

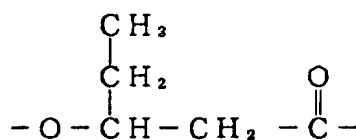
*【0004】P(3HB)は確かに自然環境中で生物的に分解するいわゆる生分解性プラスチックであるが、高分子材料としてみた場合、結晶性が高く、硬く、かつ脆い性質を持っており、実用的には不十分であった。このような欠点を克服する方法として、ポリエステルを構成しているモノマーユニットとして3HB以外の構造的に異なるモノマーユニットを組み込むことが提案されている。この方法は大別すると次の2通りに分けることができる。

10 【0005】(1) 特開昭57-150393号公報、特開昭58-69225号公報、特開昭63-269989号公報、特開昭64-48821号公報、特開平1-156320号公報によれば、本来P(3HB)を産生する微生物であるアルカリゲネス・ユートロファスを用い、炭素源として炭素数が奇数個のカルボン酸、例えばプロピオン酸や吉草酸を与えることにより、3HBと共にβ-ヒドロキシバリレート(3HVと略す)をポリエステルの構成モノマーとする共重合体P(3HB-CO-3HV)が得られる。同様に炭素源として4-ヒドロキシ酪酸やγ-ブチロラクトンを与えることにより、3HBと共に4-ヒドロキシブチレート(4HBと略す)をポリエステルの構成モノマーとする共重合体P(3HB-CO-4HB)が得られることが報告されている。

【0006】

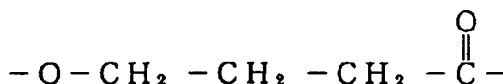
【化7】

3HV



【0007】

【化8】



※できることが報告されている。ここで、3HAの各モノマーユニット構造と炭素数との関係を明確に表現するために、このモノマーユニットをC_xユニットと呼ぶこととする。

【0009】

【化9】

【0010】前記公報によれば3HBはC₃ユニット、3HVはC₃ユニットであり、シュードモナス・オレオポランスはC₃ユニットからなる共重合体を菌体内に合成し、蓄積する性質を有している。また、Applied and Environmental Microbiology、1988、1977~1982頁には、シュードモナス・オレオポランスがポリエステルを合成するには、炭素源であるアルカンの炭素数が少なくとも6個必要であり、また炭素数が12個以上のアルカンを加えてもC₁₂ユニットを越えるユニットは合成されないことが示されている。

【0011】このように現在のところ、2つのタイプの共重合体が提示されている。即ち、(1)のタイプの共重合体は側鎖のメチレン基数が少なく、物性的にはプラスチック様高分子であり、(2)のタイプの共重合体は側鎖のメチレン基数が多く、物性的にはゲル状高分子である。しかしながら、このうち前記(1)のタイプについては、3HBの原料となる主炭素源の他に3HV、4HB等のコポリマー成分の原料を別に添加しなければならず、培養コストは高くならざるを得ないのである。このため安価な原料を用いてコポリマーを合成する菌株の探索、及び培養条件の確立が課題となっていた。

【0012】

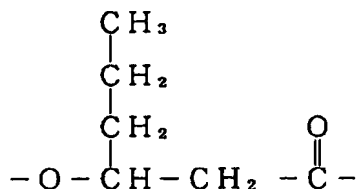
【課題を解決するための手段】本発明者らは長鎖脂肪酸や天然油脂を資化して菌体内にポリエステルを合成し、蓄積する微生物を探索していたところ、側鎖のメチレン基数が少ないプラスチック様の2成分ないし4成分系の前記(1)のタイプの共重合体を蓄積する菌株を発見し、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

【0013】即ち、本発明者らの見出した微生物の1株はオレイン酸を唯一の炭素源として生育しポリエステルの合成させるFA-440株であり、もう1つはトリオレイン(オリーブ油)を唯一の炭素源として生育しポリエステルの合成させるOL-338株である。これらの菌株が発酵合成する共重合体のモノマーユニットを分析したところ、3HBユニットとβ-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットであり、NMR分析により共重合体P(3HB-CO-3HHx)が得られることが確認された。これら2つの菌株を同定したところ、FA-440株はアエロモナス・キャビエ、OL-338株はアエロモナス・ハイドロフィラであることが判明した。

【0014】

【化10】

3HHx



【0015】本発明はこれらの微生物を見出したこと

に基づくものである。即ち、本発明の要旨は、(1)3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットを50モル%から98モル%、3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットを50モル%から2モル%含む共重合体、(2)少なくとも3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体であり、第3成分としては例えば、4-ヒドロキシブチレート(4HB)ユニット、3-ヒドロキシバリレート(3HV)ユニットまたは3-ヒドロキシプロピオネート(3HP)ユニットである共重合体、(3)少なくとも3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットを含有する4成分系のモノマーユニットからなる共重合体であり、第3および第4成分としては例えば、4-ヒドロキシブチレート(4HB)ユニット、3-ヒドロキシバリレート(3HV)ユニットおよび3-ヒドロキシプロピオネート(3HP)ユニットからなる群から選ばれる2つのユニットを有する共重合体、(4)前記(1)~(3)に記載された共重合体を合成するアエロモナス・キャビエ、並びに

【0016】(5)アエロモナス属の微生物を用いる前記(1)~(3)記載の共重合体の製造方法に関するものであり、具体的には、

1)アエロモナス属の微生物を、炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットからなる共重合体の製造方法、

2)アエロモナス属の微生物を、5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸、炭素数5以上の奇数個の脂肪酸または4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラクトンを用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシプロピオネート(3HP)ユニット、3-ヒドロキシバリレート(3HV)ユニットまたは4-ヒドロキシブチレート(4HB)ユニットを含んだ共重合体の製造方法、

3)アエロモナス属の微生物を、炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂と、①5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸、②炭素数5以上の奇数個の脂肪酸または③4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラクトンを用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットと、さらに前記それぞれの炭素源に対応する④3-ヒドロキシプロピオネート(3HP)ユニット、⑤3-ヒドロキシバリレート(3HV)ユニットまたは⑥4-

ヒドロキシブチレート(4HB)ユニットのいずれか1つのユニットの3成分系のモノマーユニットからなる共重合体の製造方法、

4) アエロモナス属の微生物を、炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂と、①5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸、②炭素数5以上の奇数個の脂肪酸または③4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラクトンのいずれか2種を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットと、さらに前記それぞれの炭素源に対応する④3-ヒドロキシプロピオネート(3HP)ユニット、⑤3-ヒドロキシバリレート(3HV)ユニットまたは⑥4-ヒドロキシブチレート(4HB)ユニットのいずれか2つのユニットの4成分系のモノマーユニットからなる共重合体の製造方法に関するものであ *

3HP

【0020】(3) 炭素数5の吉草酸など炭素数が5以上の奇数個の脂肪酸を炭素源としてポリエステルを醗酵合成すると、90モル%以上の3HVユニットを有するP(3HB-CO-3HV)が得られる。

(4) 4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラクトンを炭素源としてポリエステルを醗酵合成すると、P(3HB-CO-4HB)が得られる。

(5) 炭素数5以上の奇数個の脂肪酸と炭素数6以上の偶数個の脂肪酸の混合物を炭素源としてポリエステルを醗酵合成すると、3HB、3HV、3HHxの3成分系の共重合体が得られる。

(6) オリーブオイル、吉草酸、4-ヒドロキシ酪酸を炭素源としてポリエステルを醗酵合成すると、3HB、4HB、3HV、3HHxの4成分系の共重合体が得られる。

(7) グルコース、フルクトース、酢酸、酪酸を炭素源としてポリエステルを醗酵合成すると、P(3HB)のホモポリマーが得られる。ポリマー生成量は酪酸では大

＊る。

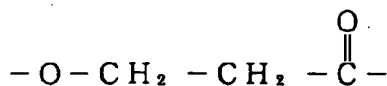
【0017】アエロモナス属の微生物を用いた本発明のポリエステルの製造方法は、従来より報告されておらず、生合成メカニズムは解明されていないが、実施例にも示されるように次のような特徴を有する。

【0018】(1) 炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステル、または天然油脂の主な構成成分である炭素数12~22の長鎖脂肪酸のうち、炭素数が偶数のものを炭素源としてポリエステルを醗酵合成すると、C₄、C₆の2つのユニットからなる共重合体P(3HB-CO-3HHx)が得られる。

(2) 5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸を炭素源としてポリエステルを醗酵合成すると、β-ヒドロキシプロピオネート(3HP)の組成が60~2モル%の共重合体P(3HB-CO-3HP)が得られる。

【0019】

【化11】



量に得られるが、グルコース、フルクトース、酢酸では微量である。

(8) カブロン酸やβ-ヒドロキシカブロン酸を炭素源として使用すると、C₆ユニットの含量を高めることができる。

【0021】本発明の微生物は、前記のようなポリエステル合成能を有するアエロモナス属の微生物であれば特に限定されるものではない。その一例として、アエロモナス・キャピエ、アエロモナス・ハイドロフィラが挙げられる。アエロモナス・キャピエの菌学的性質はFA-440株について示される表1のとおりである。このような本発明の微生物の具体例として見いだされたFA-440株およびOL-338株は、兵庫県高砂市高砂町宮前町の土壌から分離されたものであり、その内のFA-440株は微工研条寄第3432号として寄託されている。

【表1】

表1 アエロモナス・キャビエFA-440株の菌学的性質

試験項目	試験結果
形態	桿菌
グラム染色性	-
芽胞	-
運動性	+
鞭毛	極単毛
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
OF	F
Na ⁺ 要求性	-
リパーゼ	+
0/129耐性	
10ppm	耐性
150ppm	耐性
茶系水溶性色素の産生	-
37℃での生育 (ニュートリエントブロス)	+
インドール産生 (1%ペプトン水)	+
エスクリン分解	+
V-P反応	-
グルコースからのガスの産生	-
システインからの硫化水素産生	-
硝酸塩還元	+
酸の産生	
サリシン	+
シュークロース	+
グルコース	+
マンニトール	+
資化性	
L-アラビノース	+
L-アルギニン	+
ヒスチジン	+
マンニトール	+
菌体内DNAのGC含量 (モル%)	62

【0022】このような本発明のアエロモナス属の微生物は、公知の代表的なP(3HB)産生菌であるアルカリゲネス・ユートロファスとはポリエステル生合成メカニズムにおいていくつかの点で差異がみられる。

① まず、最も大きな差異はポリメラーゼのβ-ヒドロキシヘキサニルC₆O₂Aに対する特異性であって、アエロモナス属の菌株は脂肪酸のβ-酸化の過程で生成するβ-ヒドロキシヘキサニルC₆O₂Aに作用するポリメラーゼを有しているのに対し、アルカリゲネス・ユートロファスはこれを有していない。

② もう1つの大きな差異はプロピオン酸の代謝である。アルカリゲネス・ユートロファスは炭素源としてプロピオン酸を与えると、3HBと3HVの共重合体を合成する(特開昭58-69224号公報)のに対し、アエロモナス属の微生物は3HVを合成せず、かわりに3HPを作ることである。これはアエロモナス属の微生物のβ-ケトチオラーゼがプロビニルC₆O₂AとアセチルC₆O₂Aを2量化する能力のないことを示している。吉草酸を与えた場合に90モル%以上のP(3HV)を生合成

することがこれを裏付けている。

③ アセチルC₆O₂A同士の2量化自体もアエロモナス属の菌株は主ではなく、β-酸化経路の中間代謝物質β-ヒドロキシニルC₆O₂Aからのポリエステル合成が支配的である。

【0023】本発明は前記のような性質を有するアエロモナス属の微生物、及びこの微生物が発酵合成するアエロモナス属の微生物産生共重合体及びその製造方法を開示するものであり、とりわけ天然に豊富に存在する油脂ないし長鎖脂肪酸を主な原料としてC₁₂~C₁₈のモノマーユニットからなる2成分ないし4成分系のプラスチック様ポリエステル共重合体を作るための技術的手段を提供するものである。

【0024】即ち、具体的にはアエロモナス属の微生物に炭素源として炭素数6以上の偶数の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂を炭素源とした場合など天然に最も豊富に存在している油脂(植物油や魚油)を炭素源として与え、炭素源以外の栄養源の制限下、通常窒素制限下で好氣的に培養するだけでC₁₂(3

40

50

HB) : C. (3HHx) = 70~90 : 30~10の共重合体 P (3HB-CO-3HHx) を得ることができる。C. ユニット組成を高めたい場合は、炭素源としてカブロン酸やβ-ヒドロキシカブロン酸を共存させればよく、またC. ユニット組成を高めたい場合は、酪酸、β-ヒドロキシ酪酸を共存させればよい。その結果、C. (3HB) : C. (3HHx) = 50~98 : 50~2まで組成をコントロールすることができる。FA-440株、OL-338株のポリメラーゼはβ-ヒドロキシブチリルCoAの方がβ-ヒドロキシヘキシルCoAよりも親和性が高いため、C. ユニトリッチの共重合体を作ることはい

【0025】また、アエロモナス属の微生物を5-クロロ吉草酸やプロピオン酸を炭素源として発酵合成することにより、C. (3HP) 含量が40~60モル%のP (3HB-CO-3HP) が得られるが、この場合も上記と同様に3HBの原料となる酪酸、β-ヒドロキシ酪酸を共存させることによってC. ユニット含量を高めることができる。この結果、C. : C. = 40~98 : 60~2まで組成をコントロールすることができる。また、炭素数5の吉草酸など炭素数が5以上の奇数個の脂肪酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、90モル%以上の3HVユニットを有するP (3HB-CO-3HV) を得ることができる。

【0026】また、炭素源として4-ヒドロキシ酪酸やγ-ブチロラクトンを用いると、P (3HB-CO-4HB) を合成することができる。この点はアルカリゲネス・ユートロファスと同様であるが、同一培養条件ではアエロモナス属の微生物はアルカリゲネス・ユートロファスに比べ、3HB組成が高い傾向にある。炭素源として長鎖脂肪酸と4-ヒドロキシ酪酸の混合物を用いるとP (3HB-CO-3HHx-CO-4HB) を合成することもできる。

【0027】また、前記のように炭素数6以上の偶数の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂を炭素源とした場合、C.、C. の2つのユニットからなる共重合体を作り、吉草酸 (C. の脂肪酸) からはC. のみのポリエステルを作る性質を利用して、炭素数6以上の偶数の脂肪酸と吉草酸 (ないし炭素数5個以上の奇数酸) の混合炭素源を与えることにより、(C. + C.) ユニットとC. ユニット比を自由に調整できる3成分系の共重合体P (3HB-CO-3HV-CO-3HHx) を合成することができるし、又、吉草酸のかわりにプロピオン酸 (C. の脂肪酸) を与えると (C. + C.) ユニットとC. ユニット比を自由に調整できる3成分系の共重合体P (3HB-CO-3HP-CO-3HHx) を合成することができる。

【0028】前記の3成分系の共重合体の場合と同様に、アエロモナス属の微生物を炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂に加えて、5-クロロ吉草酸もしくはプロピオン酸、炭素数5以上の奇数個の脂肪酸、または4-ヒドロキシ酪酸もしくはγ-ブチロラクトンのいずれか2種を用いた混合炭素源を与えることにより、3-ヒドロキシブチレート (3HB) ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート (3HHx) ユニットと、さらに前記それぞれの追加の炭素源に対応する3-ヒドロキシプロピオネート (3HP) ユニット、3-ヒドロキシバリレート (3HV) ユニット、または4-ヒドロキシブチレート (4HB) ユニットのいずれか2つのユニットを含む4成分系のモノマーユニットからなる共重合体を合成することができる。

【0029】このように本発明においては、アエロモナス属の微生物の特徴を利用してC.、~C. ユニットからなる種々の共重合体を発酵合成することができる。現在のところ、C.、~C. ユニットの共重合体を生合成する菌株として、ロドスピリウム・ルブラムが報告されている (Int. J. Biol. Macromol., 1989, 11, 49)。即ち、フェーラーらは炭素数2~10のカルボン酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成した結果を報告しているが、これによればポリエステルはC.、C.、C. ユニットの共重合体であって、アエロモナス属の微生物のような基本的にC.、C. 2成分系コポリマーではない。従ってロドスピリウム・ルブラムでは (C. + C.) 成分とC. 成分を自由に調整できる性質を有していない。

【0030】また、酢酸や酪酸からC. ユニットが作られたり、プロピオン酸から100%のC. ユニットが作られるなど、アエロモナス属とは全く異なる合成メカニズムを有しているようである。ロドスピリウム・ルブラムが光合成細菌であり、光照射、嫌気的培养下でポリエステル合成すること、炭素数7以下のカルボン酸で主に生育し、かつポリエステル合成することから、この菌株はアエロモナス属の様なβ-酸化経路によらないように思われる。即ち、アエロモナス属の微生物が長鎖脂肪酸のβ-酸化に従って、C.、C. ユニットの2成分を合成するのに対し、ロドスピリウム・ルブラムが合成するポリエステルには規則性が認められないのである。また、ロドスピリウム・ルブラムを用いてポリエステルの合成の際の問題は、フェーラーらの論文に記述されているように、微生物の生育が光の照射の下、嫌気的条件下で培養されるため、増殖速度が極端に低いことである。従って、ポリエステルの合成速度が非常に小さく、約0.5g dry cell/リットルの菌体を得るのに10日間も要しているなど実用性に欠けることが指摘されている。これに対し、アエロモナス属の微生物は好気的な条件下で生育しポリエステル合成するので、20g dry cell

／リットルの菌株を得るのに2日で済む点など、優れた生産性を示すものである。

【0031】本発明の微生物を用いてポリエステルを発酵合成するには、炭素源以外の栄養源の制限下、通常、従来から知られている窒素源制限条件下で培養することによって容易に得られるが、炭素源以外の必須栄養源、例えば、リン、ミネラル、ビタミン等を制限してもポリエステルは誘導される。この場合、菌体の生育が抑えられるので、通常ポリエステルの発酵合成は2段階方式で行なわれる。

【0032】1段階目は菌体の増殖を目的とするものであり、栄養源の豊富な条件下で培養される。この際、菌体はポリエステル合成をほとんど行なわないので、炭素源としては脂肪酸に限らず、資化可能なものであれば自由に選択できる。1段階目で得られた菌体を洗浄回収して2段階目において新たに炭素源を加えてポリエステルを誘導培養する。従って、この2段階目の培養条件が重要であり、2段階目においては与えられる炭素源はポリエステル合成の原料であり、この炭素源の化学構造がポリエステルの構造を決定するといつてよい。従って、本発明において炭素源とは、2段階目で与えられる炭素源を意味しており、前記のように炭素源を種々調整することにより、アエロモナス属の微生物の特徴を利用してC₃～C₈ユニットからなる種々の共重合体を発酵合成することができる。このとき、窒素源も制限されるが、この際のC／N比は7以上が好ましく、窒素源を加えなくてもポリエステルの誘導は可能である。C／N比が7より小さいと炭素源は菌体の増殖のためのエネルギー代謝用、菌体構成成分の合成用に消費され、ポリエステルの合成に使用される量が減少してポリエステル収率が著しく低下する。また、この2段階目の培養条件としては、通常pH6～8、温度25～35℃、通気量0.5～2vvm、培養時間24～48hrである。

【0033】発酵合成された共重合体の菌体からの回収は、常法により行なうことができる。例えば、培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄し、減圧乾燥して得られる乾燥菌体をクロロホルム等を用いて抽出処理し、遠心分離、ろ過等により菌体除去後、抽出液にメタノールを加えて共重合体を沈澱回収することが*

*できる。

【0034】

【実施例】以下、本発明を具体的に実施例により説明するが、本発明は以下の実施例に何ら限定されるものではない。

実施例1

アエロモナス・キャビエF A-440株（微工研条寄第3432号）を以下に示す培地を用いて30℃、48時間振盪培養した。即ち、次の培地組成からなるものに水を加えて全量1リットルとし（pH7.0）、培地を調製した。

肉エキス	5 g
ペプトン	5 g
イーストエキス	2 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.1 g

【0035】培養終了後、培養ブロスと遠心分離して菌体を回収し、さらに次に示す培地中に菌体を全量加えて、30℃、24時間振盪培養した。即ち、次の培地組成からなるものに水を加えて全量1リットルとし（pH7.0）、培地を調製した。

オレイン酸	25.4 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.25 g
Tween 85	0.5 g

培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノールで洗浄し、減圧乾燥して乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体をクロロホルムで50℃、2時間抽出処理した。菌体除去後、クロロホルム抽出液にメタノールを10倍量加えてポリエステルを沈澱回収した。得られたポリエステルを硫酸酸性下で100℃、140分メタノリシスを行ない、モノマー体をメチルエステルとしてキャピラリーガスクロマトグラフにより昇温分析した。その結果を表2に示した。

【0036】

【表2】

表2 オレイン酸を炭素源としたポリエステル発酵合成（アエロモナス・キャビエ使用）

モノマー ユニット	オレイン酸（炭素源）濃度（g／リットル）				
	1.5	2.8	8.5	17.2	25.2
C ₃	0	0	0	0	0
C ₄	73	77	81	84	85
C ₅	0	0	0	0	0
C ₆	27	23	19	16	15
C ₇	0	0	0	0	0
C ₈	0	0	0	0	0

15

【0037】オレイン酸を唯一の炭素源とした場合、 $3HB(C_1) : 3HHx(C_2) = 85 : 15$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0038】実施例2

オレイン酸濃度を1.5、2.8、8.5、17.2g/リットルとして実施例1と同じ実験を行なった。その結果を同じく表2に示した。オレイン酸の濃度を低くしても C_1 、 C_2 ユニットの2成分系の共重合体が得られるが、組成が変化し、オレイン酸濃度が低いほど C_2 ユニット組成が高くなった。

【0039】実施例3

アエロモナス ハイドロフィラOL-338株を用い、炭素源としてオリーブオイルを2.8、8.5、17.2、25.4g/リットルとして実施例2と同じ実験を行った。その結果、 C_1 、 C_2 ユニットの2成分系の共重合体が得られたが、実施例2と異なり、組成比はオリーブオイル濃度に影響されずほぼ一定値を示した。

$3HB : 3HHx = 90 \sim 92 : 10 \sim 8$
(C_1) (C_2)

【0040】実施例4

炭素源として β -ヒドロキシカブロン酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB : 3HHx = 51 : 49$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0041】実施例5

炭素源としてプロピオン酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB : 3HP = 45 : 55$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0042】実施例6

炭素源として吉草酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB : 3HV = 2 : 98$ というほとんどP(3HV)ホモポリマーに近いポリマーが得られた。

【0043】実施例7

炭素源として4-ヒドロキシ酪酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB : 4HB = 75 : 25$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0044】実施例8

炭素源として天然油脂であるコーン油を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB : 3HHx = 85 : 15$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0045】実施例9

16

炭素源としてオレイン酸8g、吉草酸2gを用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB(C_1) : 3HV(C_2) : 3HHx(C_3) = 44 : 48 : 8$ からなる3成分系の共重合体が得られた。

【0046】実施例10

炭素源としてオリーブオイル4.1g、吉草酸1.7gを用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB(C_1) : 3HV(C_2) : 3HHx(C_3) = 80.2 : 11.2 : 8.6$ からなる3成分系の共重合体が得られた。

【0047】実施例11

炭素源としてオリーブオイル3.1g、4-ヒドロキシ酪酸0.69gを用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB : 4HB : 3HHx = 84.4 : 7.7 : 7.9$ からなる3成分系の共重合体が得られた。

【0048】実施例12

炭素源としてオリーブオイル0.31g、吉草酸0.17g、4-ヒドロキシ酪酸0.69gを用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なった。その結果、 $3HB : 4HB : 3HV : 3HHx = 79.7 : 8.1 : 5.4 : 6.8$ からなる4成分系の共重合体が得られた。

【0049】

【発明の効果】微生物の発酵合成するポリエステルは、自然環境下で分解する生分解性プラスチックであるが、強い特異性を有する酵素の作用で合成されるため得られるポリエステルの構造は従来より限られたものであった。これは、微生物の遺伝的性質に基づいており、

(1) 資化する炭素源が微生物によって制限されていること、(2) 炭素源の代謝、ポリエステル合成経路も決定されていることに起因している。本発明においては、長鎖脂肪酸を資化して $C_1 \sim C_4$ ユニットを合成することができ、 C_2 ユニットである $3HHx$ は $3HV$ よりもメチレン基が1個多いので可塑性が高く、柔軟性を付与する能力を有する。また C_3 ユニットである $3HP$ も強度を保持しながらも弾性を与えることができる。このように、本発明によりアエロモナス属の微生物を用いると、剛性のプラスチックから弾性を帯びたプラスチックまで、共重合体の成分とその組成を調整することにより幅広くつくり出すことができる。特に、共重合体の成分として重要な $3HHx$ (C_2 ユニット)は、安価な原料である天然油脂から合成することができるので、経済的にも非常に有利なものである。

【手続補正書】

【提出日】平成4年11月10日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正内容】

【0035】 培養終了後、培養ブ罗斯を遠心分離して菌体を回収し、さらに次に示す培地中に菌体を全量加えて、30℃、24時間振盪培養した。即ち、次の培地組成からなるものに水を加えて全量1リットルとし（pH 7.0）、培地を調製した。

オレイン酸	25.4g
KH ₂ PO ₄	1.5g
K ₂ HPO ₄	1.5g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.25g
Tween 85	0.5g

培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノールで洗浄し、減圧乾燥して乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体をクロロホルムで50℃、2時間抽出処理した。菌体除去後、クロロホルム抽出液にメタノールを10倍量加えてポリエステルを沈澱回収した。得られたポリエステルを硫酸酸性下で100℃、140分メタノリシスを行ない、モノマー体をメチルエステルとしてキャピラリーガスクロマトグラフにより昇温分析した。キャピラリーガスクロマトグラフはHP589011（Hewlett Packard社製）を用いて行った。使用したカラムはJ&W社製のヒューズド・シリカ・キャピラリーカラムDB-5（カラム内径0.25mm、液層膜厚0.25μm、カラム長30m）である。初発温度60℃、3分、昇温速度8℃/分、最終温度240℃、3分の条件で行った。図1は3-ヒドロキシ脂肪酸のメチルエステルのガスクロマトグラフによる分析結果である。図1中のNo. 1～No. 6は以下の標準物質を表わす。

No. 1：3-ヒドロキシプロピオネート

No. 2：3-ヒドロキシブチレート

No. 3：3-ヒドロキシバリラート

No. 4：3-ヒドロキシヘキサノエート

No. 5：3-ヒドロキシオクタノエート

No. 6：3-ヒドロキシデカノエート

図2中、No. 1は3-ヒドロキシブチレートに対するピークを、No. 2は3-ヒドロキシヘキサノエートに対するピークを表わす。また*はポリエステル加水分解の際に副生する、3-ヒドロキシブチレートに由来するクロトン酸のピークを示す。図1と図2を比較すると明らかなように、実施例1で得られたポリエステルは3HB（3-ヒドロキシブチレート）と3HHx（3-ヒドロキシヘキサノエート）の2つのモノマーユニットから成る共重合体であることがわかる。その結果を表2に示した。図3は同じく実施例1で得られたポリエステルの¹³C-NMR（75MHz）の解析結果であるが、この結果からもこのポリエステルが3HBと3HHxの2成分からなる共重合体であることが確認された。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】追加

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、3-ヒドロキシ脂肪酸のメチルエステル（標準物質）のガスクロマトグラフによる分析結果を示した図である。

【図2】 図2は、実施例1で得られたポリエステルを加水分解（メタノリシス）したモノマー体のガスクロマトグラフによる分析結果を示した図である。

【図3】 図3は、実施例1で得られたポリエステルの¹³C-NMR（75MHz）の解析結果を示した図である。

【手続補正3】

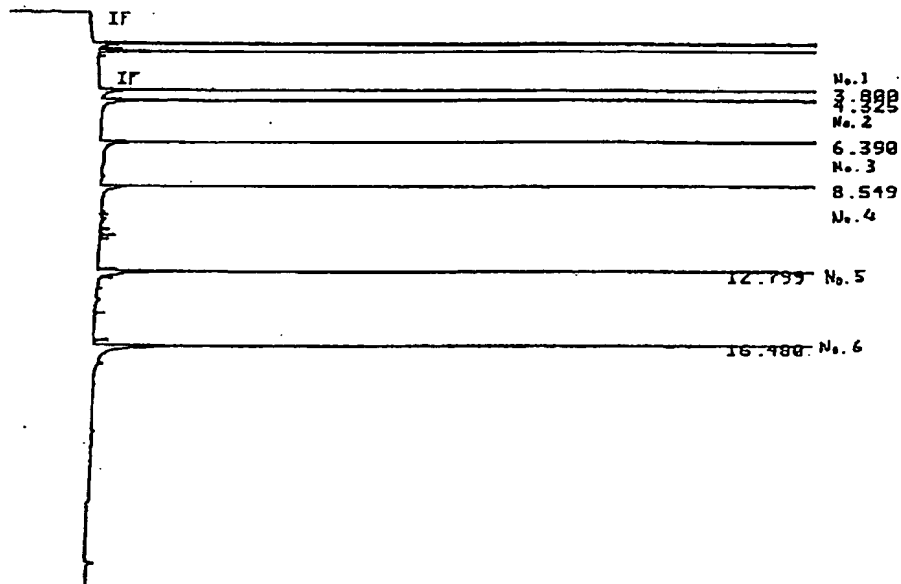
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

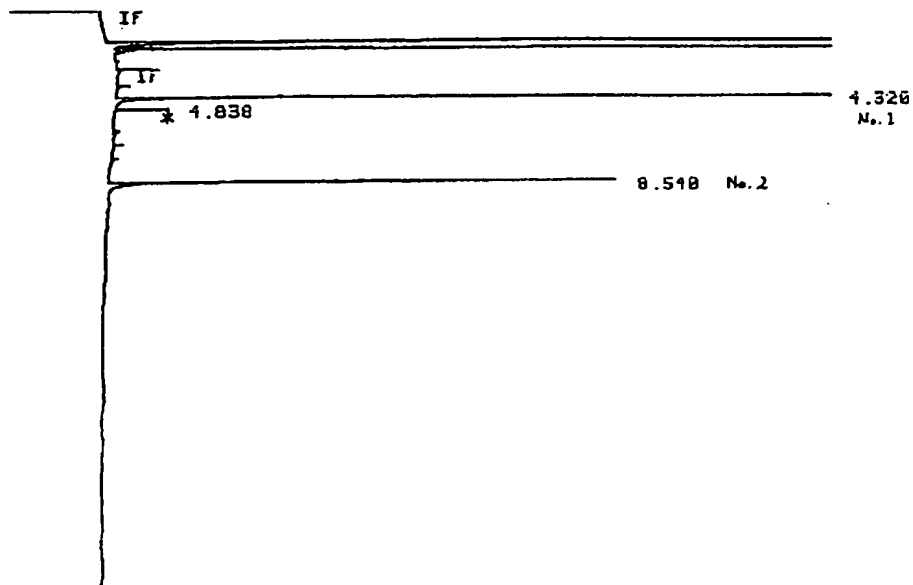
【補正方法】追加

【補正内容】

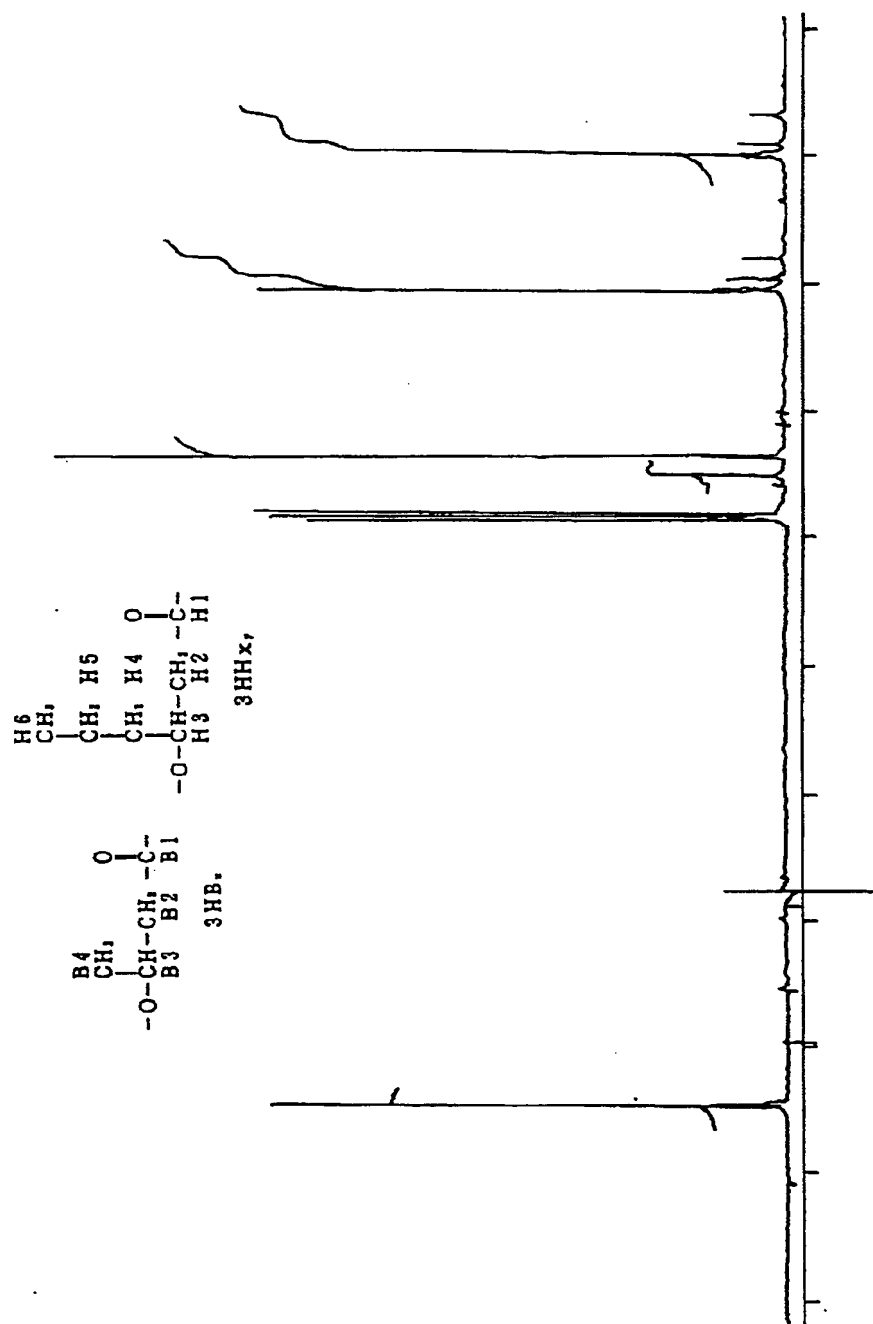
【図1】



【図2】



【図3】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)